

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 839 660

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

02 06084

⑤① Int Cl⁷ : B 01 J 19/00, C 12 P 1/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.05.02.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.11.03 Bulletin 03/47.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR.

⑦② Inventeur(s) : COMBETTE PHILIPPE, CONSTANTIN
OLIVIER, VINET FRANCOISE et MARCHAND GILLES.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤④ MICROREACTEUR, SON PROCEDE DE PREPARATION, ET PROCEDE POUR REALISER UNE REACTION
BIOCHIMIQUE OU BIOLOGIQUE.

⑤⑦ Microréacteur comprenant un canal d'entrée ou d'alimentation, une zone d'entrée ou d'alimentation par un courant de fluide, une zone de réaction, une zone de sortie et un canal de sortie ou d'évacuation, lesdites zones et canaux se trouvant en communication fluidique et au moins un composé telle qu'une enzyme susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique avec au moins un constituant dudit courant de fluide étant fixé sur les surfaces desdites zones d'entrée, zone de réaction, et zone de sortie.

FR 2 839 660 - A1



MICROREACTEUR, SON PROCEDE DE PREPARATION,
ET PROCEDE POUR REALISER UNE REACTION BIOCHIMIQUE
OU BIOLOGIQUE

5

DESCRIPTION

La présente invention a trait à un microréacteur.

L'invention concerne également un procédé
10 pour préparer, fabriquer un tel microréacteur.

L'invention est enfin relative à un procédé pour réaliser une réaction biochimique ou biologique qui met en œuvre ledit microréacteur.

Le domaine de l'invention peut être défini
15 comme celui des systèmes miniaturisés ou microsystèmes qui sont utilisés essentiellement pour l'analyse chimique et la synthèse.

Les domaines de prédilection des microréacteurs chimiques sont les réactions en phase
20 liquide et gazeuse incluant la catalyse homogène et hétérogène, l'oxydation catalytique, la synthèse hétérocyclique et les réactions photochimiques.

En particulier, ces procédés ont montré l'intérêt qu'il y a à utiliser la technologie des
25 microréacteurs pour la chimie en solution et les bioapplications biologiques.

Des exemples de microsystèmes d'analyse ou de microréacteurs de synthèse sont plus précisément décrits dans les documents [1] à [9].

En particulier, le document [3] concerne la fabrication de nanocolonnes pour la chromatographie liquide par des techniques de microusinage.

Les microcolonnes comportent des
5 « monolithes », de préférence hexagonaux supportant la phase stationnaire, et sont pourvues de canaux d'entrée et de sortie présentant une architecture particulière avec un réseau de canaux qui fait que le courant de liquide pénétrant dans la colonne est partagé en deux,
10 de manière répétée avant qu'il n'atteigne la tête de la colonne.

Le nombre total de canaux (C) de la colonne chromatographique, proprement dite, qui peut être alimenté est, par exemple, de $C = 2^n$, où n est le
15 nombre de fois où le courant liquide est partagé.

La phase stationnaire est constituée de poly(sulfate de styrène) électrostatiquement lié.

Le poly(styrène sulfate) est absorbé à partir d'une solution sur la surface des canaux après
20 silylation des parois des canaux, en utilisant du (gamma-aminopropyl)-triméthoxysilane.

A l'instar du document [3], le brevet US-A-6 156 273 décrit une colonne de séparation par chromatographie, électrochromatographie et
25 électrophorèse, qui comporte de multiples structures supports monolithiques voisines, qui définissent des canaux interconnectés.

Les surfaces des monolithes peuvent être traitées pour fournir des interactions entre ces
30 surfaces et un échantillon qui traverse la colonne de

séparation, afin d'effectuer une séparation des constituants de l'échantillon.

Parmi les revêtements dont peuvent être pourvus les monolithes, on peut citer, par exemple, les
5 revêtements d'anticorps, les revêtements cationiques ou anioniques, les chélatants, les revêtements organiques, tels que les sucres complexes et l'héparine, les gels et les revêtements en phase inverse, tels que le C18.

Dans ce document, il ne se produit aucune
10 réaction dans la colonne, et aucun nouveau produit provenant de la réaction du revêtement se trouvant sur les surfaces des monolithes avec les constituants de l'échantillon traité n'est généré.

On est en présence dans ce document d'un
15 simple processus chromatographique courant avec rétention plus ou moins importante des divers constituants de l'échantillon traversant la colonne en fonction de leur affinité pour le revêtement.

Dans le document [9], l'enzyme et le produit
20 à traiter, à digérer réagissant en phase liquide, en solution, dans la masse du fluide, les inconvénients d'une telle manière d'opérer (par rapport à l'invention, où l'enzyme est fixée sur la paroi) sont les suivants : réactions parasites comme, par exemple,
25 l'autolyse dans le cas d'une enzyme de digestion et, par voie de conséquence, la limitation des concentrations.

Le taux de digestion peut être optimisé en confinant les réactions de digestion dans des volumes
30 plus petits. Les volumes disponibles dans des dispositifs intégrés sur puces permettent d'utiliser

des quantités très faibles d'échantillons et ceci dans des zones de réaction très petites, afin d'augmenter les taux de digestion. Il a été récemment montré qu'il était possible de digérer des protéines à l'intérieur
5 de puits réalisés dans des microdispositifs. Comme on l'a déjà vu, la digestion étant réalisée en solution conduit à une autodigestion des protéines qui peuvent interférer avec une analyse par spectrométrie de masse. Ce phénomène est d'autant plus important, lorsqu'on
10 désire améliorer la vitesse de digestion en augmentant les concentrations en espèces protéolytiques.

L'utilisation de billes fonctionnalisées permet de réduire considérablement cette autolyse, augmente également la stabilité de l'enzyme, et fournit
15 des vitesses de digestion plus élevées, puisque la quantité d'enzyme de digestion peut être considérablement augmentée.

Cependant, l'opération de remplissage des microcanaux, à l'aide de billes fonctionnalisées,
20 demeure une opération délicate et peu fiable.

Il ressort de ce qui précède qu'il existe un besoin pour un microréacteur qui permette de réaliser des réactions chimiques et/ou biologiques avec un rendement très élevé, avec une quantité de réactif, tel
25 qu'une enzyme, faible et à une vitesse également élevée.

Par exemple, dans le cas de la digestion enzymatique, il existe un besoin pour un microréacteur qui, tout en limitant les problèmes d'autolyse,
30 fournisse des vitesses élevées et soit d'une mise en

œuvre fiable, facile, au contraire des microréacteurs utilisant des billes fonctionnalisées.

Le but de la présente invention est donc de fournir un microréacteur qui réponde, entre autres, à
5 ces besoins.

Le but de la présente invention est encore de fournir un microréacteur qui ne présente pas les inconvénients, limitations, défauts et désavantages des microréacteurs de l'art antérieur.

10 Ce but et d'autres encore sont atteints, conformément à l'invention par un microréacteur comprenant un canal d'entrée ou d'alimentation, une zone d'entrée ou d'alimentation pour un courant de fluide, une zone de réaction et une zone de sortie et
15 un canal de sortie ou d'évacuation, lesdites zones et canaux se trouvant en communication fluide :

- ladite zone d'entrée comprenant des moyens pour communiquer audit courant de fluide une vitesse d'écoulement constante, pour
20 répartir de manière homogène le courant de fluide sur toute la section de ladite zone de réaction et pour augmenter le rapport surface/volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide vers la
25 zone de réaction ;
- ladite zone de réaction comprenant des moyens lui conférant un rapport surface sur volume élevé ;
- au moins un composé susceptible de produire
30 une réaction biologique ou biochimique avec au moins un constituant dudit courant de

fluide étant fixé sur les surfaces desdites zones d'entrée, zone de réaction et zone de sortie ;

5 - ladite zone de sortie comprenant des moyens pour rassembler le courant de fluide issu de la zone de réaction comprenant les produits issus de ladite réaction biologique ou biochimique, et pour réduire le rapport surface sur volume au fur et à
10 mesure de la progression du courant de fluide depuis la zone de réaction vers ledit canal de sortie et pour évacuer ledit courant de fluide.

 Le microréacteur, selon l'invention, se
15 distingue, tout d'abord, fondamentalement du dispositif décrit, par exemple, dans le brevet US-A-6 156 273, qui est, fondamentalement, un dispositif de séparation obéissant aux règles classiques de la chromatographie et non un dispositif visant à réaliser une réaction,
20 c'est-à-dire un réacteur.

 Dans ce document US-A-6 156 273, des composés sont fixés aux parois du dispositif, mais ils ont pour but de retenir plus ou moins les divers constituants de l'échantillon liquide qui traverse le dispositif.

25 On est en présence d'un phénomène de rétention typique en chromatographie, qui a pour but de prolonger plus ou moins longtemps le séjour des constituants du liquide traité dans la colonne, afin d'en assurer la sortie échelonnée et donc la
30 séparation.

Les constituants du liquide traité ne subissent aucune transformation dans la colonne et aucun nouveau produit n'est généré à l'intérieur de la colonne.

5 Au contraire, l'invention a trait non à un dispositif de séparation, mais à un réacteur, ce qui signifie que les composés fixés sur les surfaces des diverses zones du dispositif, à savoir : du microréacteur, selon l'invention, produisent une
10 réaction biologique ou biochimique avec au moins un constituant du courant de fluide, que ce constituant est transformé et que des produits nouveaux sont créés, puis recueillis.

 En d'autres termes, dans le réacteur, selon
15 l'invention, un échantillon qui circule dans le réacteur va, selon l'invention, interagir avec les composés susceptibles de réagir, fixés sur les surfaces du réacteur et ainsi créer des produits issus de cette réaction, au contraire, de nouveau du dispositif selon
20 le document US-A-6 156 273, où les composés, le revêtement fixés aux parois favorisent simplement l'accrochage plus ou moins prolongé des constituants de l'échantillon, mais ne génèrent pas de nouveaux produits.

25 Le dispositif, selon l'invention, est également fondamentalement différent des dispositifs décrits notamment dans le document [9], dans lesquels la réaction entre le composé, susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique, et au moins un
30 constituant du courant de fluide, se produit en phase liquide, en solution, ledit composé n'étant absolument

pas immobilisé, fixé aux surfaces du dispositif, comme dans le microréacteur, selon l'invention.

Grâce à cette caractéristique essentielle du microréacteur, selon l'invention, les concentrations
5 des espèces immobilisées sur la surface peuvent être augmentées largement sans apparition des réactions parasites, comme, par exemple, l'autolyse dans le cas d'une enzyme de digestion.

Enfin, par rapport aux microréacteurs
10 comprenant un garnissage de microbilles, le microréacteur, selon l'invention, a l'avantage d'être plus fiable, plus simple à préparer, et d'avoir, de même, un fonctionnement fiable et simple.

Le dispositif, selon l'invention, est
15 qualifié de microréacteur, cette dénomination est couramment utilisée dans ce domaine de la technique et est parfaitement claire pour l'homme du métier. Toutefois, il pourrait être utile de préciser que la plus grande dimension du microréacteur, selon
20 l'invention, qui est, par exemple, sa longueur ou hauteur, est généralement de 10 mm à 30 mm.

Bien entendu, des dimensions différentes peuvent être exigées par les applications et/ou la nature des produits utilisés.

25 Le composé, susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique, peut être tout composé répondant à une telle définition, mais il est généralement choisi parmi les enzymes.

En d'autres termes, il peut s'agir de tout
30 composé susceptible d'interagir avec un constituant, ou molécule cible, présent dans le courant de fluide qui

traverse le microréacteur, et de transformer ledit
constituant par une réaction de biologie moléculaire
pour obtenir, à partir de ce constituant, un nouveau
produit. Il peut s'agir par exemple d'une interaction
5 et réaction de type enzyme/substrat, où ledit composé
est un enzyme et ledit constituant un substrat dudit
enzyme.

L'homme du métier trouvera de nombreuses autres
applications évidentes de la présente invention à
10 partir de cette définition.

Selon l'invention, lorsque ce composé est une
enzyme, il peut être choisi dans la classe des
oxydoréductases, la classe des transférases, la classe
des hydrolases, la classe des lyases, la classe des
15 isomérases, ou la classe des ligases ou synthétases.

Il peut s'agir par exemple d'une enzyme à
activité lytique, telle qu'une protéase, une nucléase,
une lipase, une glycolase, une kinase, etc. ; d'une
enzyme présentant une activité de modification ou
20 d'action sur des acides nucléiques, telle que l'ADN ou
l'ARN polymérase, la primase, l'ADN ligase, une
nucléase, une transcriptase reverse, une kinase, une
phosphatase, une phosphorylase, une endonucléase de
restriction, une topo-isomérase, une transférase, etc.

25 Parmi les protéases, on peut citer par exemple
les endopeptidases telles que la pepsine, la trypsine,
la chymotrypsine, les cathepsines A, B et C ; et les
exopeptidases telles que les carbopeptidases, les
aminopeptidases, et les dipeptidases.

30 De préférence, l'enzyme est la trypsine et le
substrat un peptide ou une protéine.

Selon la présente invention, lorsque le composé qui est susceptible d'interagir avec le constituant du fluide est une enzyme, le micro-réacteur peut être appelé microréacteur à enzymes. Par exemple
5 dans le cas où l'enzyme est la trypsine, il peut être appelé microréacteur trypsique ; ou encore, par exemple dans le cas où l'enzyme est une polymérase, microréacteur à polymérases.

Le composé susceptible de produire une
10 réaction biologique ou biochimique est fixé auxdites surfaces, par exemple, par couplage par covalence, par des interactions mettant en jeu des ligands, ou par toute autre méthode permettant d'immobiliser ce composé sur la surface.

15 Le microréacteur, selon l'invention, peut avoir une forme quelconque, mais il présente avantageusement une forme sensiblement allongée, les trois zones décrites plus haut étant définies sur un substrat sensiblement plan, le courant de fluide
20 s'écoulant sensiblement selon l'axe longitudinal dudit réacteur.

Avantageusement, les moyens de la zone de réaction, qui lui confèrent un rapport surface sur volume élevé, sont constitués par des plots - ou
25 monolithes, tels qu'ils sont désignés dans l'art antérieur - comportant une base sur ledit support reliée à un sommet par une paroi sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits plots étant régulièrement espacés selon un réseau
30 bidimensionnel et définissant entre leurs parois des canaux reliés entre eux et sensiblement parallèles à

l'axe longitudinal du microréacteur et axe d'écoulement du courant de fluide.

Lesdits plots peuvent avoir une forme quelconque, mais, de manière avantageuse, leurs bases
5 et leurs sommets auront une forme choisie parmi les disques, ellipses, et polygones, de préférence réguliers, tels que carrés, losanges, hexagones, etc..

La forme préférée pour la base des plots ou monolithes est celle d'un hexagone régulier ou bien
10 celle d'un carré.

La taille de ces plots est celle, par exemple, de leur base et/ou sommet, par exemple, en forme de carré ou d'hexagone régulier et elle est définie par le fait que cette base ou sommet, de
15 préférence, en forme de carré ou d'hexagone régulier, peut s'inscrire dans un cercle d'un rayon de 1 à 20 μm , de préférence de 2 à 10 μm , par exemple de 5 μm .

Bien entendu, des dimensions différentes peuvent être exigées par les applications et/ou la
20 nature des produits utilisés.

Avantageusement, lesdits plots sont disposés en rangées dont l'axe est sensiblement perpendiculaire à l'axe longitudinal du microréacteur ou axe d'écoulement du courant de fluide, les plots
25 appartenant à deux rangées successives étant disposés en quinconce, c'est-à-dire directement décalés.

Avantageusement, l'espacement entre les axes de deux rangées successives est généralement de 10 à 30 μm , par exemple 12 μm et d'espacement entre les
30 centres des bases de deux plots dans une même rangée est de 10 à 30 μm , par exemple de 14 μm .

Bien entendu, des dimensions différentes peuvent être exigées par les applications et/ou la nature des produits utilisés.

Avantageusement, les moyens de la zone d'entrée, définis plus haut, pour communiquer au courant de fluide une vitesse d'écoulement constante, pour répartir de manière homogène le courant de fluide sur toute la section de la zone de réaction et pour augmenter le rapport surface sur volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide vers la zone de réaction, sont constitués par des déflecteurs comportant une base sur le support reliée à un sommet par une paroi sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits déflecteurs divisant le canal d'entrée en C canaux, cette division étant répétée n fois, de sorte que le nombre de canaux à l'entrée de la zone de réaction est égal à C^n , n et C étant des nombres entiers, et la section totale des canaux à chaque division étant constante et égale à la section du canal d'entrée.

De préférence, $C = 2$ ou 3 , de préférence encore $C = 2$ et n est un entier de 2 à 10. Le nombre n n'a pour limite que la dimension choisie du microréacteur.

Avantageusement, les moyens de la zone de sortie pour rassembler le courant de fluide issu de la zone de réaction et pour réduire le rapport surface sur volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide depuis la zone de réaction vers ledit canal de sortie - lesdits moyens étant identiques aux moyens prévus dans la zone d'entrée - sont constitués par des

défecteurs comportant une base sur le support reliée à un sommet par une paroi sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits défauteurs rassemblant les canaux de la zone de réaction en divisant leur nombre par S , cette division étant répétée m fois pour former un seul canal ou canal de sortie. S et m sont des entiers, de préférence, $S = 2$ ou 3 , de préférence encore $S = 2$ et m est un entier de 2 à 10 . Le nombre m a les mêmes limites que le nombre n .

Avantageusement, le microréacteur comprend, en outre, un capot ou couvercle recouvrant lesdites zones et lesdits canaux d'entrée et de sortie.

Le capot ou couvercle est éventuellement pourvu d'orifices d'entrée et/ou de sortie.

L'invention concerne, en outre, un ensemble de microréacteurs, tels que décrits plus haut, formés sur un substrat et comprenant de 2 à 50 microréacteurs ou plus selon l'encombrement de chacun de ces microréacteurs.

De préférence, les microréacteurs dudit ensemble diffèrent les uns des autres par la forme des plots et/ou la taille des plots et/ou leur répartition (par exemple, écartement des plots et des rangées) et/ou leur longueur.

L'invention concerne également un système formé sur un substrat et comprenant au moins un microréacteur, tel que défini plus haut, un réservoir d'alimentation en fluide, relié audit canal d'entrée ou d'alimentation et un réservoir de sortie de fluide relié audit canal de sortie.

Selon une forme de réalisation, le réservoir d'alimentation en fluide est prévu sur le substrat sur lequel est formé le microréacteur, par exemple, gravé dans le substrat, et le canal d'entrée est également
5 prévu sur le substrat, par exemple, gravé dans le substrat.

Selon une autre forme de réalisation, le réservoir d'alimentation en fluide est placé à l'extérieur du substrat sur lequel est formé le
10 microréacteur et le canal d'entrée - qui relie le réservoir au microréacteur - se présente sous la forme d'un tube capillaire.

Les mêmes agencements peuvent être prévus pour le réservoir de sortie de fluide.

15 Avantageusement, le microréacteur, le système ou l'ensemble, décrits plus haut, peuvent être reliés à un dispositif d'analyse, tel qu'un spectromètre de masse, de préférence par l'intermédiaire d'un capillaire conduisant à un « electrospray », ou à un
20 dispositif d'électrophorèse capillaire.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un microréacteur, tel que décrit plus haut, ledit procédé comprenant les étapes successives suivantes :

- 25
- gravure des trois zones du microréacteur et, éventuellement, des canaux d'entrée et de sortie, dans un substrat sensiblement plan ;
 - capotage, fermeture du microréacteur par un
30 capot ou couvercle ;

- fixation d'un composé susceptible de produire un réacteur biologique ou chimique sur les surfaces du microréacteur.

De préférence, la gravure est réalisée par un
5 procédé de gravure sèche isotrope ou anisotrope.

Avantageusement, le substrat est en un matériau choisi parmi la silice, le silicium oxydé, le silicium, les polymères, matières plastiques, et résines, tels que les silicones, les résines époxy et
10 élastomères.

Avantageusement, ladite fixation est réalisée par un couplage par covalence ou par des interactions mettant en jeu des ligands.

Si le substrat est en silice ou silicium
15 oxydé et le composé à fixer est une enzyme, alors la fixation est réalisée par la suite d'étapes suivantes :

- réhydratation en milieu basique pour obtenir des sites silanols ;
- silanisation du substrat avec un silane
20 époxydé réactif, tel que le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane ;
- hydrolyse de l'époxyde pour donner un diol ;
- oxydation du diol en aldéhyde ;
- 25 - immobilisation de l'enzyme, telle que la trypsine par réaction des fonctions amines de la lysine avec les aldéhydes ;
- éventuellement, réaction des liaisons imines ainsi formées avec un réducteur.

30 L'invention concerne enfin un procédé pour réaliser une réaction biochimique ou biologique, dans

lequel on fait circuler un courant de fluide dans le microréacteur, tel que décrit plus haut, afin que au moins un constituant dudit courant de fluide réagisse avec le composé susceptible de produire une réaction
5 biologique ou biochimique, et on recueille à la sortie du microréacteur un courant de fluide comprenant le(les) produit(s) de ladite réaction.

De préférence, ladite réaction est une réaction de type enzyme/substrat, ledit composé
10 susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique est une enzyme, ledit constituant dudit courant de fluide est un substrat de l'enzyme et le(les) produit(s) de la réaction sont le(les) produit(s) issu(s) de la réaction dudit enzyme avec
15 ledit substrat.

L'enzyme peut être choisi parmi tous les enzymes, tels qu'ils ont été définis ci-dessus.

De préférence, ladite réaction est une réaction de digestion enzymatique par une protéase,
20 ledit composé susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique est une protéase, lesdits constituants du courant de fluide sont des peptides ou des protéines et les produits de la réaction sont des segments peptidiques.

25 De préférence encore, l'enzyme est la trypsine.

L'invention va maintenant être décrite de manière détaillée dans la description qui va suivre, donnée à titre illustratif et non limitatif, en
30 référence aux dessins joints, dans lesquels :

- la figure 1 est une vue latérale en coupe représentant un schéma général d'un microréacteur, selon l'invention ;
- 5 - la figure 2 est un graphique qui donne le rapport surface/volume (S/V) (en unités arbitraires) pour chaque étage (E) de l'entrée d'un microréacteur, selon l'invention ;
- 10 - la figure 3 est une vue de dessus de l'entrée et de la sortie d'un microréacteur, selon l'invention, réalisé sur un substrat plan ;
- 15 - la figure 4 est une vue de dessus représentant des détails de l'entrée (et de la sortie) et du bord d'un microréacteur, selon l'invention, et montrant la disposition et les dessins de plots d'un microréacteur, selon l'invention, ces plots ayant une base et un sommet en forme d'hexagone régulier ;
- 20 - les figures 5A à 5F montrent la fabrication d'un microréacteur, selon l'invention, dans un substrat en silicium, mettant essentiellement en œuvre un procédé de photolithographie ;
- 25 - les figures 6 et 7 sont des photographies réalisées au microscope électronique à balayage d'un réacteur fabriqué, selon l'invention. Sur la figure 6, le repère représente 200 μm ; et sur la figure 7, le repère représente 50 μm .
- 30

Le microréacteur, selon l'invention, dont le schéma général est illustré sur la figure 1, comprend une zone d'entrée (1), une zone de réaction (2) formant le « réacteur », proprement dit, et, enfin, une zone de
5 sortie (3).

Le microréacteur, montré de manière schématique sur la figure 1, a une forme allongée : il s'agit de la forme préférée du réacteur avec une longueur, par exemple, de 10 à 30 mm, tandis que sa
10 petite dimension ou largeur ou diamètre, est, par exemple, de 0,5 mm à 1 mm, ce qui justifie le terme de « microréacteur ». Ces dimensions sont données à titre d'exemple et peuvent être largement modifiées selon les besoins.

Il est à noter que le microréacteur, selon l'invention, peut avoir, par exemple, la configuration de la colonne du document US-A-6 156 273, cité plus haut, mais on rappelle qu'il s'en distingue
15 fondamentalement par le fait qu'il comporte un composé fixé sur ses surfaces permettant une réaction, qu'ils s'agit donc d'un réacteur et non d'un dispositif de
20 séparation.

La zone d'entrée (1) est généralement constituée d'un microcanal, suivi d'un système de
25 chicanes disposées dans le sens longitudinal du microréacteur. Ce système de chicanes ou déflecteurs permet d'imposer pour un débit fixé du courant de fluide en amont du microréacteur, une vitesse d'écoulement constante dans tout le réseau de canaux à
30 travers les chicanes, avant d'entrer dans le réacteur principal. Le réseau de canaux favorise également une

distribution, une répartition homogène du fluide pour le disperser sur toute la largeur de la zone de réaction.

Enfin, la disposition, par exemple, dichotomique des chicanes ou déflecteurs, permet d'augmenter le rapport surface/volume au fur et à mesure de l'avancement du courant de fluide vers le cœur du microréacteur.

La figure 2, donnée à titre d'exemple, montre le rapport surface sur volume (S/V) pour chaque étage de l'entrée d'un microréacteur, selon l'invention. On constate que plus on se rapproche du début de la zone de réaction (étage 8), plus le rapport surface/volume est élevé.

L'augmentation du rapport surface sur volume améliore au fur et à mesure le rendement de la réaction biologique ou biochimique, jusqu'à atteindre son optimum dans le cœur du réacteur, c'est-à-dire dans la zone, dite zone de réaction.

L'augmentation de surface est, de préférence, apportée par la présence de plots sensiblement verticaux sur un substrat, ces plots peuvent présenter des géométries diverses et également des tailles et des pas divers, comme cela est décrit plus loin, en relation avec la figure 3. La longueur du microréacteur est également variable.

La longueur est généralement fixée, afin de pouvoir optimiser le rendement du réacteur, pour un encombrement minimal.

La zone de sortie du microréacteur (3) est, de préférence, de forme identique à l'entrée, cette

partie permet, notamment, de rassembler les différents produits issus de la réaction biologique ayant eu lieu dans le microréacteur, c'est-à-dire essentiellement dans la zone de réaction (2) avant de les utiliser
5 ultérieurement, par exemple, de les analyser.

Il est possible, sur un même substrat, par exemple une même plaquette (« wafer ») d'intégrer plusieurs microréacteurs, c'est-à-dire de former un ensemble de microréacteurs sur le même substrat.

10 De préférence, les microréacteurs se trouvant sur un même substrat seront différents, les différences portant, par exemple, sur la géométrie des plots, permettant d'augmenter le rapport surface sur volume et/ou l'écartement entre plots et/ou l'écart entre
15 rangées et/ou la longueur du réacteur. L'entrée du réacteur est uniquement modifiée en fonction de la taille des plots adoptés.

La figure 3 est une vue de dessus de l'entrée du microréacteur, selon l'invention, réalisée sur un
20 substrat plan.

Le microréacteur est alimenté par un canal « microcanal » (31) de largeur, par exemple, 100 μm , qui aboutit dans un canal ou distributeur (32) de largeur, par exemple, 400 μm , puis, enfin, dans le
25 premier étage (33) de la zone d'entrée proprement dite, qui a une largeur de, par exemple, 640 μm .

Le canal formant le premier étage se divise, une première fois en deux canaux (34) et (35) dont les largeurs sont égales, à savoir : à 320 μm , et dont la
30 somme des largeurs est égale à celle du canal unique (33).

Au total, le canal unique du premier étage est divisé six fois, chacun des canaux d'un étage étant divisé en deux canaux de largeur égale et la largeur totale des canaux de chaque étage étant constante et
5 toujours égale à la largeur du canal du premier étage (640 μm). Dans le dernier étage de la zone d'entrée, les canaux (36) sont au nombre de soixante-quatre et ont chacun une largeur, par exemple de 10 μm .

Les dimensions en microns de la zone d'entrée
10 de microréacteur, illustrée sur la figure 1, ont été indiquées dans le tableau I suivant, ces dimensions sont données uniquement à titre d'exemple :

TABLEAU I

Dimension	μm
a	1 500
b	350
c	300
d	250
e	200
f	150
g	100
h	50
i	25
j	100
k	400
l	640
m	320
n	160
o	80
p	40
q	20
r	10
s	128
t	70
u	90
v	35
w	15
x	8
y	4
z	2
aa	1
ab	64
ac	32
ad	16
ae	8
af	4

La figure 3 peut représenter aussi bien l'entrée que la sortie d'un microréacteur, selon l'invention. Il suffit pour cela de renverser la figure 3, le canal (31) situé alors en bas de la figure, 5 représente le canal de sortie ou d'évacuation.

Sur la figure 4, on a représenté les détails de l'entrée (et de la sortie) et du bord d'un microréacteur, selon l'invention.

On retrouve sur cette figure les canaux (36), 10 déjà décrits plus haut, qui aboutissent dans la zone de réaction, proprement dite, (41) du microréacteur, selon l'invention.

Dans cette zone, sont disposés en rangées parallèles (41), (42), (43), (44), etc., des plots 15 (45), etc., l'axe de ces rangées est perpendiculaire à l'axe longitudinal du microréacteur et à l'axe d'écoulement du courant de fluide.

Sur la figure 4, les plots ont une base et un sommet en forme d'hexagone régulier, chacun de ces 20 hexagones s'inscrivant dans un cercle de rayon A, qui est généralement de 1 à 10 μm , par exemple de 5 μm (à titre d'exemple).

Les plots des deux rangées successives sont disposés en quinconce et forment, entre eux, des canaux 25 parallèles du sens d'écoulement 46, qui se divisent en canaux 47, qui ensuite se rejoignent en des canaux 48 de nouveau parallèles au sens d'écoulement.

Dans une même rangée, les centres des plots, par exemple des hexagones sont espacés de 10 à 30 μm , 30 par exemple, de 14 μm (B) et les axes de deux rangées

successives sont espacés généralement de 10 à 30 μm , par exemple de 12 μm (C).

Sur la figure 4, on note que le bord de la zone de réaction reprend la forme extérieure des plots dans le but de conserver une section de canal constante et d'éviter la dispersion de la vitesse d'écoulement du fluide entre les bords et le centre du réacteur.

La zone de réaction s'évase lentement depuis la zone d'entrée et les canaux (36) par une partie tronconique définie par les dimensions D et E, par exemple, D = 70 μm et E = 10 μm , pour aboutir dans le cœur ou centre de la zone de réaction limitée par des parois essentiellement parallèles dont l'une (50) est représentée sur la figure 4.

La zone de réaction assure pratiquement toute la fonction biologique du microréacteur.

L'augmentation de surface est précisément apporté par la présence des plots qui peuvent, outre la géométrie hexagonale représentée sur la figure, présenter d'autres géométries, par exemple les plots peuvent être en forme de losange, d'ellipse, de disque, et avoir également une taille et un pas (écart entre deux plots) différents, par exemple de 10 à 30 μm .

De préférence, on utilise une section soit hexagonale, comme sur la figure 4, soit carrée, qui s'inscrit dans un cercle de diamètre variable, par exemple de 2 à 20 μm , ceci afin d'obtenir un compromis entre une surface maximale, définissant un réseau de microcanaux interconnectés pratiquement parallèles à l'axe longitudinal du microréacteur (la présence de canaux perpendiculaires à l'axe longitudinal induirait

la stagnation de produit et diminuerait le rendement du microréacteur) et de minimiser la complexité de la réalisation technologique.

5 Comme on l'a indiqué plus haut, la zone de sortie est généralement symétrique à la zone d'entrée.

Le microréacteur, selon l'invention, peut être fabriqué pour tout procédé adéquat, mais dans le cas où il est réalisé sur, dans un substrat, essentiellement plan, le microréacteur peut être, par
10 exemple, réalisé par gravure sèche anisotrope (ou isotrope) dans du silicium, en utilisant, par exemple, un procédé du type DRIE ICP (Deep Reactive Ion Etching/Inductively Coupled Plasma, en anglais).

Les motifs - par motif, on entend les canaux
15 d'alimentation et d'évacuation, les zones d'entrée, de réaction, de sortie, formés, par exemple, par les déflecteurs et plots - sont alors définis dans le silicium par un masque de gravure, par exemple par une résine photosensible, couramment utilisée en
20 microélectronique, ou, par exemple, par de la silice, ce masque étant d'épaisseur suffisante pour permettre la gravure des motifs dans le silicium, à l'épaisseur choisie par l'opérateur, par exemple, de 50 μm à 100 μm .

25 Les motifs peuvent être définis dans ce masque de gravure, par exemple, par un procédé de lithographie classiquement rencontré en microélectronique, suivi, par exemple, dans le cas de la silice d'une gravure ionique réactive de ce
30 matériau.

Les réacteurs peuvent aussi être, par exemple, réalisés par gravure sèche anisotrope dans de la silice, le masque de protection choisi pouvant être alors, par exemple, du silicium. Le microréacteur peut
5 aussi être réalisé dans d'autres matériaux, par exemple, en polymères, tels que résines époxy, élastomères, plastiques.

L'utilisation des microtechnologies permet de fabriquer, à l'aide de gravure anisotrope ou isotrope
10 des structures aux géométries complexes et présentant des rapports de surfaces sur volume très important, sans les inconvénients des garnissages de microbilles.

Le réacteur peut ensuite être capoté, par exemple, par une plaque en PDMS (polydiméthylsiloxane),
15 comportant ou non des orifices d'entrée et/ou de sortie, après traitement dudit capot et du réacteur par un plasma d'oxygène, tel que décrit dans la littérature. Dans ce cas, le PDMS est connu pour avoir des propriétés d'adhésion spontanée sur la plupart les
20 supports solides.

Le réacteur peut être, aussi, par exemple, capoté par scellement moléculaire d'une plaque de silice ou d'une plaque de verre, comportant ou pas des orifices d'entrée et/ou de sortie, après nettoyage et
25 préparation chimique des deux substrats hydroxylés (substrat SiO_2 sur silicium/capot verre ou silice). La présence de sites silanols (SiOH) en surface attire spontanément les molécules d'eau et les deux pièces du microcomposant, à savoir : capot et réacteur, collent
30 l'une à l'autre par l'intermédiaire de molécules d'eau. Par chauffage, une partie de l'eau contenue entre les

deux surfaces est éliminée jusqu'à l'obtention d'environ trois couches de molécules d'eau qui rendent possible l'adhésion.

5 Ou bien le microréacteur peut être, par exemple, capoté par scellement anodique d'une plaque de verre, comportant ou pas des orifices d'entrée et/ou de sortie.

10 Ou bien le microréacteur peut être, par exemple, capoté par collage d'une plaque polymère choisie par l'utilisateur, comportant ou pas des orifices d'entrée et/ou de sortie, en utilisant, par exemple, un procédé de dépôt de colle par sérigraphie.

15 Ce type de collage est constitué de trois étapes principales : la sérigraphie, qui consiste à appliquer de la colle uniquement sur certaines zones du substrat, le collage qui consiste à mettre en contact le substrat enduit localement de colle et le capot, et, enfin, le chauffage qui induit la polymérisation de la colle. La polymérisation peut s'effectuer par voie
20 photochimique si la colle est polymérisable sous UV.

Enfin, le microréacteur peut être, par exemple, capoté par scellement direct silicium/silicium (SDB : Silicon Direct Bonding, en anglais) à une plaque de silicium, comportant ou pas des orifices d'entrée
25 et/ou de sortie.

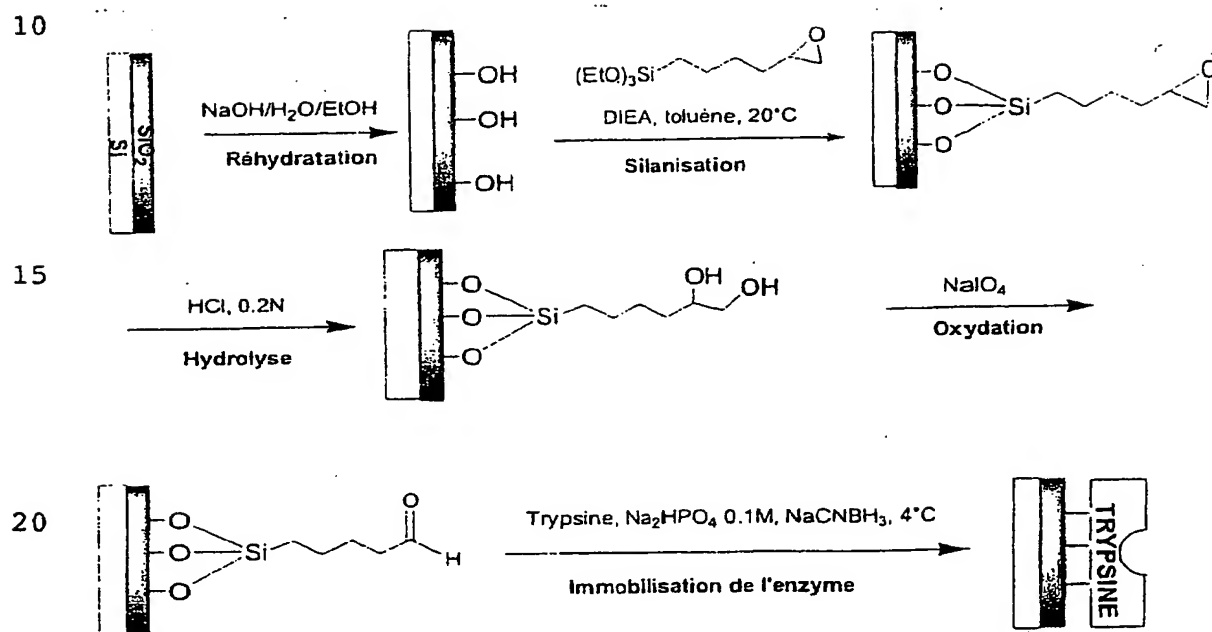
La fixation du constituant doté de la fonction biologique ou biochimique dans le microréacteur, qui peut être, par exemple, une enzyme de type trypsine, peut être réalisée selon différentes
30 méthodes :

- par un couplage par covalence reliant la molécule à fixer à la surface du microréacteur ;
- par des interactions mettant en jeu des ligands.

5 Ainsi, dans le cas d'une enzyme, telle que la trypsine, sa fixation sur un substrat en silice, peut se faire par des étapes successives de réhydratation, silanisation, par exemple avec un silane époxydé
10 réactif, hydrolyse, oxydation et, enfin, immobilisation, fixation de l'enzyme par l'intermédiaire des liaisons $-NH_2$, portés par les groupes lysine de la trypsine.

15 Le schéma 1 suivant illustre les étapes et les conditions opératoires qui peuvent être utilisées pour l'immobilisation d'une enzyme, telle que la trypsine.

5

SCHEMA 1

A titre indicatif, de la trypsine portant une fonction biotine (trypsine biotinylée, type XI-B de SIGMA ALDRICH®) a été fixée sur des surfaces circulaires, de l'ordre de 1 mm de diamètre.

5 Après une étape de marquage avec de la streptavidine, portant un fluorophore Cy₃, et une excitation de 550 nm, une image de fluorescence est obtenue à 580 nm, dont l'intensité est de 225UA. Le rapport signal/bruit (trypsine/substrat) est compris
10 entre 35 et 40.

Pour réaliser une réaction à l'intérieur du microréacteur, selon l'invention, on fait passer à l'aide d'un dispositif adéquat, tel qu'un pousse-seringue et sa seringue associée, ou autre, le
15 courant de liquide dont un des constituants peut réagir avec le composé fixé sur les parois du microréacteur. Le débit est un débit, de préférence, constant, assurant un temps de séjour à l'intérieur du microréacteur de 1 à 15 minutes, par exemple en
20 fonction de la cinétique de la réaction dans le microréacteur. Les produits de la réaction sont envoyés vers un dispositif d'analyse, tel qu'un spectromètre de masse, ou vers une autre utilisation, par exemple une électrophorèse capillaire.

25 L'invention va maintenant être décrite, en référence aux exemples suivants, donnés à titre illustratif et non limitatif.

ExemplesExemple 1

5 Cet exemple illustre la fabrication d'un microréacteur en silicium, en référence à la figure 5 jointe.

 On dépose sur un substrat (51) en silicium de quatre pouces (10, 16 cm), de type <100> et d'épaisseur
10 525 μm , une couche de résine photosensible 52 de type SHIPLEY® S 1813 par spin-coating (tournette).

 On procède ensuite à une lithographie à l'aide d'un faisceau insolateur UV (53) au travers d'un masque (54) pourvu ou de n motifs définissant la
15 géométrie des microréacteurs ; le temps d'insolation est de 10 secondes.

 Ce motif est soumis à une désoxydation des fonds de motif à l'aide d'un appareil RIE Nextral NE 110 dans une atmosphère de CHF_3/O_2 à un
20 rapport de débit de 50/10 sccm, sous une pression de 100 mT, avec une puissance de 10 W, pendant 1 minute.

 Ensuite, on grave les zones non protégées par la résine à l'aide d'un appareil de gravure profonde du type DRIE ICI STS MULTIPLE.

25 L'étape suivante consiste à découper le masque de résine par HNO_3 fumant sans ultrasons pendant 5 minutes.

 Les flancs de la gravure sont alors nettoyés par oxydation en four à tube sous oxygène pendant 50
30 minutes à 1 000°C et désoxydation chimique à l'aide de HF pendant quelques secondes.

On réalise ensuite une oxydation épaisse des motifs sur une épaisseur de 3 μm (55) dans un four à tube sous vapeur d'eau à 1 00°C pendant 18 heures et 50 minutes.

5 Chaque microréacteur est ensuite découpé et séparé du wafer. Un capot en polydiméthylsiloxane est ensuite utilisé pour la fermeture du microréacteur. Le scellement du capot et du microréacteur est réalisé après traitement pas plasma oxygène des deux surfaces à
10 mettre en contact (appareil TEGAL, plasma O₂, pression 100 mTorr, temps d'activation 30 secondes). La connexion du microréacteur avec tout dispositif de mise en circulation de fluide est réalisée via des capillaires insérés dans les canaux d'entrée et de
15 sortie du microréacteur.

 Le microréacteur utilisé dans l'exemple de digestion présente une géométrie de plot hexagonale avec des plots de diamètre 10 microns, séparés les uns des autres de 14 microns sur un axe perpendiculaire à
20 la direction du flux de liquide et de 12 microns sur un axe parallèle au flux du liquide. La profondeur du microréacteur, définie comme étant la hauteur moyenne des plots est de 50 microns.

25 Exemple 2

 Dans cet exemple, on réalise la fixation, l'immobilisation de la trypsine sur les surfaces du microréacteur fabriqué dans l'exemple 1 pour obtenir un
30 microréacteur « fonctionnalisé », selon l'invention.

Puis, on vérifie l'immobilisation de la trypsine par fluorescence.

La trypsine utilisée est une trypsine de type I, issue de pancréas de bovin, commercialisée par la
5 Société SIGMA ALORICA® (réf. T 8003).

Le mécanisme réactionnel est composé de plusieurs étapes, à savoir :

- 10 - une réhydratation en milieu basique permettant d'obtenir des sites silanols, une silanisation du substrat avec le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane conduisant à la formation de films) ;
- une hydrolyse pour transformer la fonction époxyde en fonction diol ;
- 15 - une oxydation en fonction aldéhyde et, enfin, l'immobilisation de l'enzyme par réaction des fonctions amines portées par les lysines avec les fonctions aldéhydiques. Les liaisons imines, ainsi
20 formées, sont stabilisées par réaction avec un réducteur. Le protocole précis, utilisé dans cet exemple, est décrit ci-après.

1. Réhydratation

25

NaOH Brown : NaO 4,9 g ;

EDI 14,7 ml ;

EtOH 19,6 ml ;

Remplissage du microréacteur à 3 µl/m,
30 réaction 2 heures à température ambiante. Vidange du réacteur sous flux d'azote, puis lavage à l'eau

désionisée (100 µl à 3 µl/mn). Etuve 15 minutes à 80°C.
Rinçage au toluène (50 µl à 3 µl/mn).

2. Silanisation

5

Toluène 10 ml ;

DIEA 50 µl ;

5,6-époxydexyltriéthoxysilane 25 µl ;

Remplissage du microréacteur à 3 µl/mn, puis

10 lavage à l'éthanol (100 µl à 3 µl/mn) ;

Réticulation 3 heures à 110°C.

3. Hydrolyse

15

HCl 0,2 N. Remplissage du réacteur à 3 µl/mn.

Réaction sous flux de HCl pendant 3 heures à température ambiante. Vidange, puis lavage à l'eau désionisée (100 µl à 3 µl/mn).

Séchage 30 minutes à 110°C.

20

4. Oxydation

NaIO₄ 6,6 µg ;

Eau désionisée 3 ml.

25

Réaction sous flux desdits réactifs (100 µl à 3 µl) pendant 1 heure à température ambiante. Vidange et séchage sous flux d'azote.

5. Immobilisation de l'enzyme

La solution contenant l'enzyme à immobiliser est introduite dans le microréacteur à un débit fixé.

5 Une fois le microréacteur rempli, ses extrémités sont bouchées avec du parafilm. La réaction d'immobilisation est alors effectuée en statique.

En utilisant ce schéma réactionnel et le
10 protocole associé, de la trypsine biotinylée (trypsine biotinylée, type XI-B de SIGMA ALDRICH® se présentant sous la forme d'une solution de trypsine 2,5 mg/ml, Na_2HPO_4 à 0,1 M, NaCNBH_3 0,05 M), a été immobilisée sur la surface interne du microréacteur présentant des
15 colonnes de 10 μm de diamètre, espacées de 5 μm , et de hauteur égale à 50 μm , puis révélée avec une solution de streptavidine Cy_3 .

Le couple biotine/streptavidine- Cy_3 est révélé par fluorescence à 570 nm.

20 L'observation au microscope à épi-fluorescence permet de visualiser la présence de trypsine sur toute la surface des microcolonnes et sur l'ensemble du réacteur tryptique.

25 Exemple 4

Dans cet exemple, on réalise une digestion de BSA dans le microréacteur pourvu d'une enzyme immobilisé, selon l'invention, préparée dans l'exemple
30 3.

Par l'intermédiaire d'un pousse-seringue, le réservoir d'entrée du microréacteur est rempli d'une solution de « Bovin Serum Albumine (BSA) » à 2 mg/ml avec 0,05 % de NaN_3 à un débit moyen de l'ordre de 5 $\mu\text{l}/\text{mn}$. Le temps de séjour, dans le microréacteur, de la protéine à digérer est de l'ordre de 5 minutes. Au bout de quelques minutes, le volume infusé à travers le microréacteur est suffisamment important pour permettre une analyse correcte au spectromètre de masse type MALDI_TOF. Le spectre obtenu montre des segments peptidiques issu de la digestion de la BSA.

REFERENCES

- [1] P. D. I. FLETCHER, S. J. HASWELL, V. N. PAUNOV,
Analyst 124, 1 273-1 282 (1999).
- 5 [2] T. MCCREEDY, Analytica chimica acta 427, 39-43
(2001).
- [3] B. He, H. TAIT, F. REGNIER, Analytical chemistry
10 70, 3 790-3 797 (1998).
- [4] B. He, L. TAN, F. REGNIER, Analytical chemistry
71, 1 464-1 468 (1999).
- 15 [5] B. He, J. Ji, F. REGNIER, Journal of
chromatography A 853, 257-262 (1999).
- [6] B. He, B. J. BURKE, X. ZHANG, R. ZHANG, F. REGNIER
(Site web de analytical chemistry, 2000).
- 20 [7] B. E. SLENTZ, N. A. PENNER, F. REGNIER, Journal of
chromatography A, à paraître, pas encore
communiqué (2001).
- 25 [8] L. XIONG, F. REGNIER, Journal of chromatography A
924, 165-176 (2001).
- [9] Chemical abstract 2001 : 335 569, MIYAZAKI M. et
al, Chem. Lett. (2001), (5), 442-443.
- 30 [10] Chemical abstract 2000 : 811 299 CAPLUS.

REVENDICATIONS

1. Microréacteur comprenant un canal d'entrée ou d'alimentation, une zone d'entrée (1) ou d'alimentation par un courant de fluide, une zone de réaction (2), une zone de sortie (3) et un canal de sortie ou d'évacuation, lesdites zones et canaux se trouvant en communication fluidique :

10 - ladite zone d'entrée (1) comprenant des moyens pour communiquer audit courant de fluide une vitesse d'écoulement constante, pour répartir de manière homogène le courant de fluide sur toute la section de ladite zone de réaction (2) et pour
15 augmenter le rapport surface/volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide vers la zone de réaction (2) ;

20 - ladite zone de réaction (2) comprenant des moyens lui conférant un rapport surface sur volume élevé ;

au moins un composé susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique avec au moins un constituant dudit courant de fluide étant fixé sur les surfaces desdites
25 zones d'entrée (1), zone de réaction (2), et zone de sortie (3) ;

30 - ladite zone de sortie (3) comprenant des moyens pour rassembler le courant de fluide issu de la zone de réaction (2) comprenant les produits issus de ladite réaction biologique ou biochimique, et pour réduire

le rapport surface sur volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide depuis la zone de réaction (2) vers ledit canal de sortie et pour évacuer ledit courant de fluide.

2. Microréacteur selon la revendication 1, dans lequel la plus grande dimension dudit microréacteur est de 10 mm à 30 mm.

3. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit composé susceptible de produire une réaction biochimique ou biologique est une enzyme et ledit constituant dudit courant de fluide est un substrat dudit enzyme.

4. Microréacteur selon la revendication 3, dans lequel ladite enzyme est choisie dans la classe des oxydoréductases, la classe des transférases, la classe des hydrolases, la classe des lyases, la classe des isomérases, ou la classe des ligases ou synthétases.

5. Microréacteur selon la revendication 3 ou la revendication 4, dans lequel l'enzyme est une enzyme à activité lytique, telle qu'une protéase, une nucléase, une lipase, une glycolase, une kinase, etc. ; une enzyme présentant une activité de modification ou d'action sur des acides nucléiques, telle que l'ADN ou l'ARN polymérase, la primase, l'ADN ligase, une nucléase, une transcriptase reverse, une kinase, une phosphatase, une phosphorylase, une endonucléase de restriction, une topo-isomérase, et une transférase.

6. Microréacteur selon la revendication 5, dans lequel la protéase est choisie parmi les

endopeptidases telles que la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, les cathepsines A, B et C ; et les exopeptidases telles que les carbopeptidases, les aminopeptidases, et les dipeptidases.

5 7. Microréacteur selon la revendication 3, dans lequel l'enzyme est la trypsine et le substrat de celle-ci un peptide ou une protéine.

8. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le composé
10 susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique est fixé auxdites surfaces par couplage par covalence ou par des interactions mettant en jeu des ligands.

9. Microréacteur selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 8, présentant une forme sensiblement allongée et formé sur un substrat sensiblement plan, sur lequel sont définies lesdites trois zones (1, 2, 3), le courant de fluide s'écoulant sensiblement selon l'axe longitudinal dudit réacteur.

20 10. Microréacteur selon la revendication 9, dans lequel les moyens de la zone de réaction lui conférant un rapport surface sur volume élevé sont constitués par des plots (45) comportant une base sur ledit support, reliée à un sommet par une paroi
25 sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits plots étant régulièrement espacés selon un réseau bidimensionnel et définissant entre les parois des canaux (46, 48) reliés entre eux et sensiblement parallèles à l'axe longitudinal du microréacteur et axe
30 d'écoulement.

11. Microréacteur selon la revendication 10, dans lequel la base et le sommet desdits plots (45) ont une forme choisie parmi les ellipses, disques, et polygones de préférence réguliers, tels que losanges, carrés, hexagones, etc..

12. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel les plots (45) ont une base et un sommet en forme d'hexagone régulier.

13. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel les plots (45) ont une base en forme de carré.

14. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, dans lequel la base et le sommet desdits plots (45), de préférence, en forme de carrés ou d'hexagones réguliers peuvent être inscrits dans des cercles d'un rayon (A) de 1 à 20 μm , de préférence de 2 à 10 μm , par exemple de 5 μm .

15. Microréacteur selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, dans lequel lesdits plots (45) sont disposés en rangées (42, 43, 44) dont l'axe est sensiblement perpendiculaire à l'axe longitudinal du microréacteur d'axe d'écoulement, les plots (45) appartenant à deux rangées successives (43, 44) étant disposés en quinconce.

16. Microréacteur selon la revendication 15, dans lequel l'espacement (C) entre les axes de deux rangées successives est de 10 à 30 μm , par exemple 12 μm et l'espacement (B) entre les centres des bases de deux plots (45) dans une même rangée (44) est de 10 à 30 μm , par exemple 14 μm .

17. Microréacteur selon la revendication 8, dans lequel les moyens de la zone d'entrée pour communiquer au courant de fluide une vitesse d'écoulement constante pour répartir de manière
5 homogène le courant de fluide sur toute la section de la zone de réaction et pour augmenter le rapport surface sur volume au fur et à mesure de la progression du courant de fluide vers la zone de réaction, sont constitués par des déflecteurs comportant une base sur
10 le support reliée à un sommet par une paroi sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits déflecteurs divisant le canal d'entrée en C canaux, cette division étant répétée n fois, de sorte que le nombre de canaux à l'entrée de la zone de
15 réaction est égal à C^n , n et C étant des nombres entiers, et la section totale des canaux à chaque division étant constante et égale à la section du canal d'entrée.

18. Microréacteur selon la revendication 17,
20 dans lequel $C = 2$ ou 3 et n un entier de 2 à 10.

19. Microréacteur selon la revendication 9, dans lequel les moyens de la zone de sortie pour rassembler le courant de fluide issu de la zone de réaction et pour réduire le rapport surface sur volume
25 au fur et à mesure de la progression du courant de fluide depuis la zone de réaction vers ledit canal de sortie, lesdits moyens étant identiques aux moyens prévus dans la zone d'entrée, sont constitués par des déflecteurs comportant une base sur le support reliée à
30 un sommet par une paroi sensiblement perpendiculaire au plan dudit substrat, lesdits déflecteurs rassemblant

les canaux de la zone de réaction en divisant leur nombre par S, cette division étant répétée m fois, pour former un seul canal ou canal de sortie.

20. Microréacteur selon l'une quelconque des
5 revendications 9 à 19, comprenant, en outre, un couvercle ou capot recouvrant lesdites zones et lesdits canaux, pourvu éventuellement d'orifices d'entrée et/ou de sortie.

21. Ensemble de microréacteurs selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 20 formés sur un substrat et comprenant de 2 à 50 microréacteurs.

22. Ensemble de microréacteurs selon la
revendication 21 et la revendication 10, dans lequel
lesdits microréacteurs diffèrent les uns des autres par
15 la forme des plots et/ou la taille des plots et/ou leur répartition et/ou la longueur du microréacteur.

23. Système formé sur un substrat et
comprenant au moins un microréacteur selon l'une
quelconque des revendications 1 à 20, un réservoir
20 d'alimentation en fluide, relié audit canal d'entrée ou d'alimentation, et un réservoir de sortie de fluide relié audit canal de sortie.

24. Système selon la revendication 23, dans
lequel le réservoir d'alimentation en fluide est prévu
25 sur le substrat sur lequel est formé le microréacteur, par exemple gravé dans le substrat et le canal d'entrée est également prévu sur le substrat, par exemple gravé dans le substrat.

25. Système selon la revendication 23, dans
30 lequel le réservoir d'alimentation en fluide est placé à l'extérieur du substrat sur lequel est formé le

microréacteur et le canal d'entrée se présente sous la forme d'un tube capillaire.

26. Procédé de préparation d'un microréacteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, ledit
5 procédé comprenant les étapes successives suivantes :

- gravure des trois zones du microréacteur et, éventuellement, des canaux d'entrée et de sortie, dans un substrat sensiblement plan ;
- 10 - capotage, fermeture du microréacteur par un capot ou couvercle ;
- fixation d'un composé susceptible de produire un réacteur biologique ou chimique sur les surfaces du microréacteur.

15 27. Procédé selon la revendication 26, dans lequel la gravure est réalisée par procédé de gravure sèche isotrope ou anisotrope.

28. Procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 27, dans lequel le substrat est en
20 un matériau choisi parmi la silice, le silicium, le silicium oxydé, les polymères, matières plastiques et résines, tels que les silicones, résines époxy et les élastomères.

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 28, dans lequel ladite fixation est
25 réalisée par un couplage par covalence ou par des interactions mettant en jeu des ligands.

30 30. Procédé selon la revendication 26, dans lequel le substrat est en silice ou en silicium oxydé et le composé à fixer est une enzyme, et la fixation est réalisée par la suite d'étapes suivantes :

- réhydratation en milieu basique pour obtenir des sites silanols ;
- silanisation du substrat avec un silane époxydé réactif, tel que le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane ;
- hydrolyse de l'époxyde pour donner un diol ;
- oxydation du diol en aldéhyde ;
- immobilisation de l'enzyme, telle que la trypsine par réaction des fonctions amines de la lysine avec les aldéhydes ;
- éventuellement, réaction des liaisons imines ainsi formées avec un réducteur.

31. Procédé pour réaliser une réaction biochimique ou biologique dans lequel on fait circuler un courant de fluide dans un microréacteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, afin que au moins un constituant dudit courant de fluide réagisse avec le composé susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique, et on recueille à la sortie du microréacteur un courant de fluide comprenant le(les) produit(s) de ladite réaction.

32. Procédé selon la revendication 31, dans lequel ladite réaction est une réaction de type enzyme substrat, ledit composé susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique est une enzyme, ledit constituant du courant de fluide est un substrat de l'enzyme, et les produits de la réaction sont les produits issus de la réaction dudit enzyme avec ledit substrat.

33. Procédé selon la revendication 31, dans lequel ladite réaction est une réaction de digestion enzymatique par une protéase, ledit composé susceptible de produire une réaction biologique ou biochimique est
5 une protéase et lesdits constituants du courant de fluide sont des peptides ou des protéines et les produits de la réaction sont des segments peptidiques.

34. Procédé selon la revendication 33, dans lequel l'enzyme est la trypsine.

10

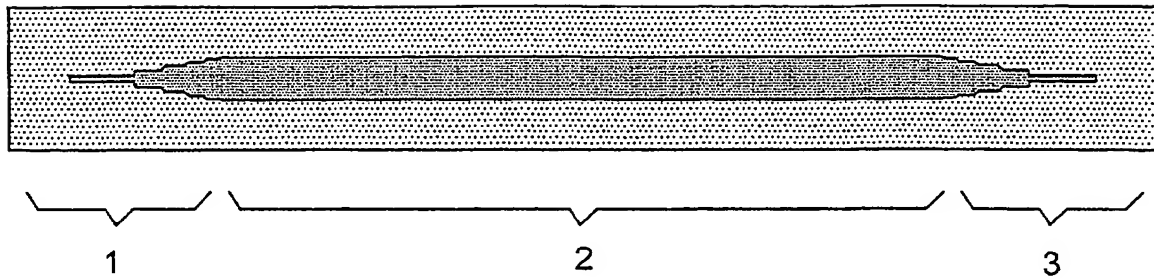


FIG. 1

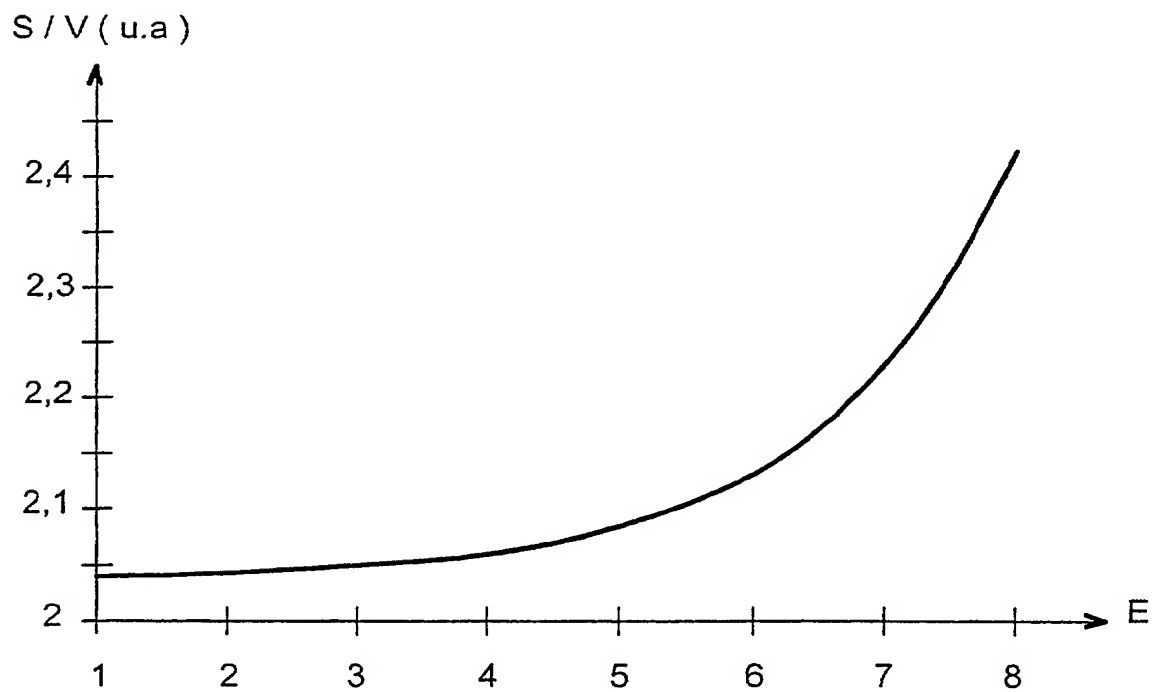


FIG. 2

2 / 5

FIG. 3

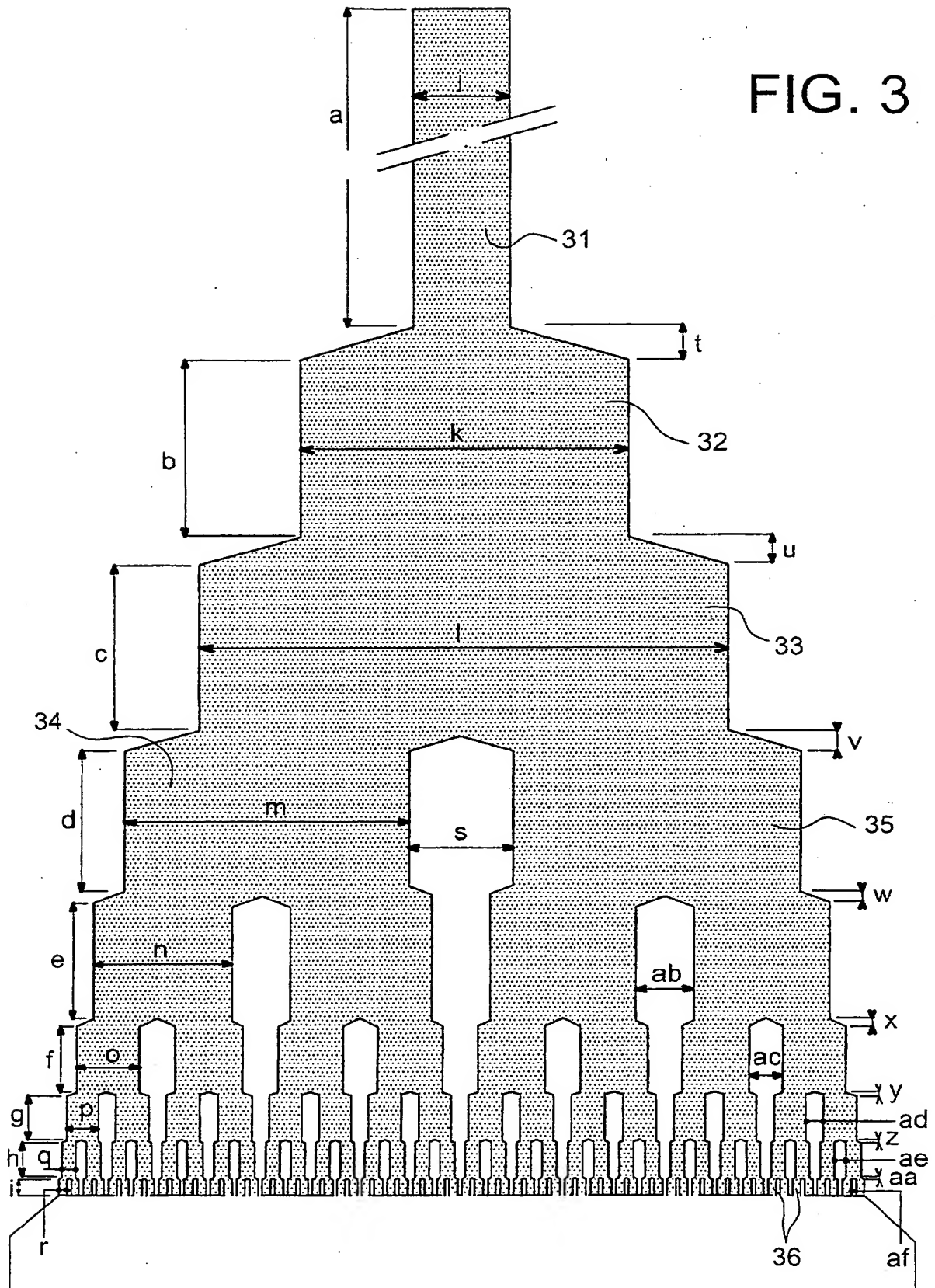
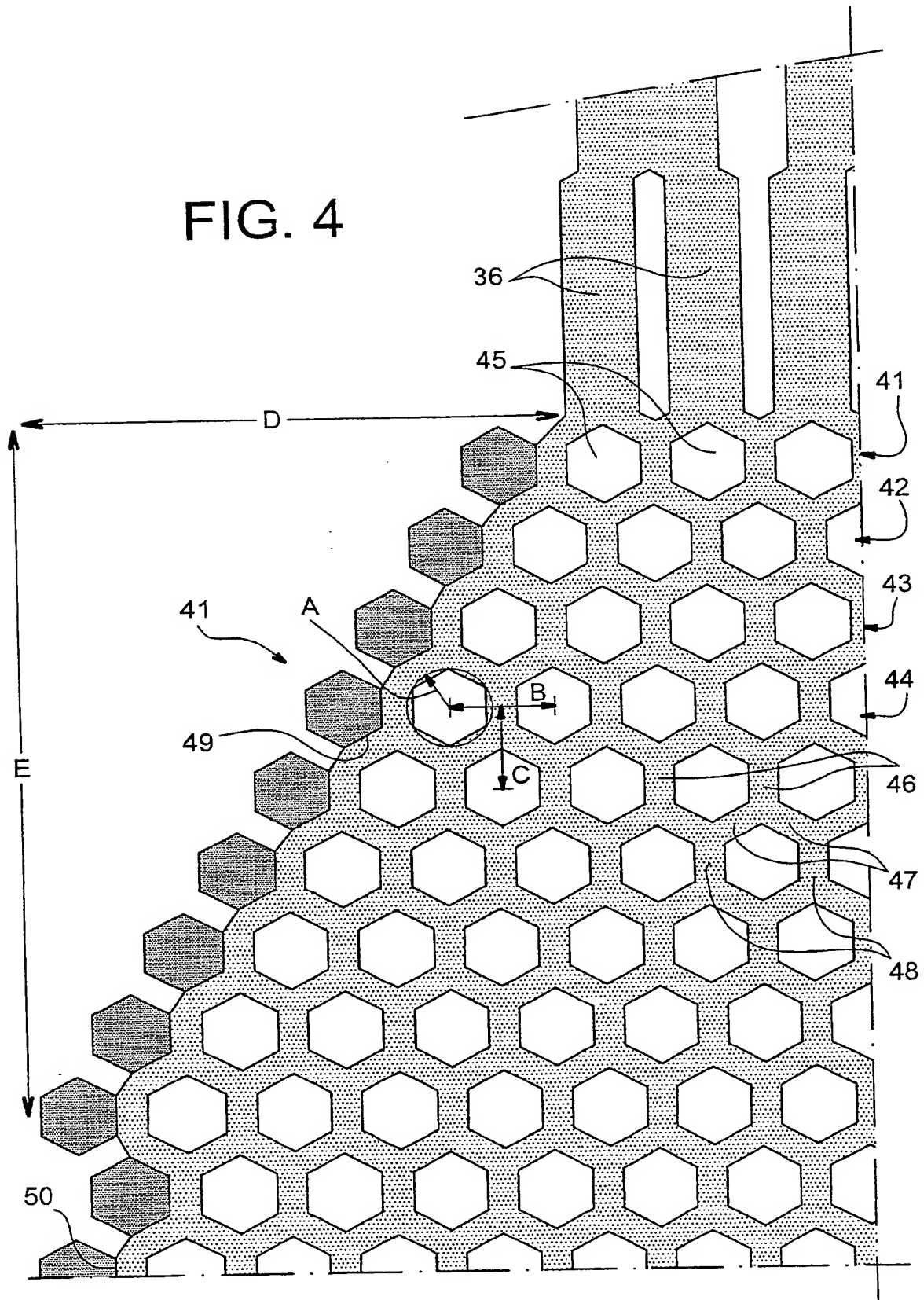


FIG. 4



4 / 5

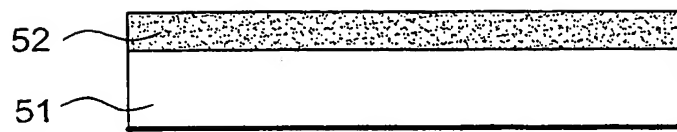


FIG. 5A

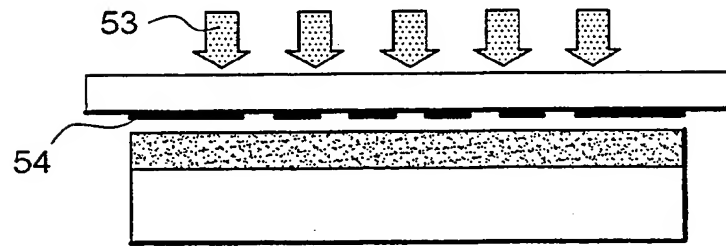


FIG. 5B



FIG. 5C

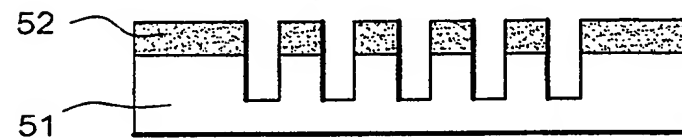


FIG. 5D



FIG. 5E



FIG. 5F

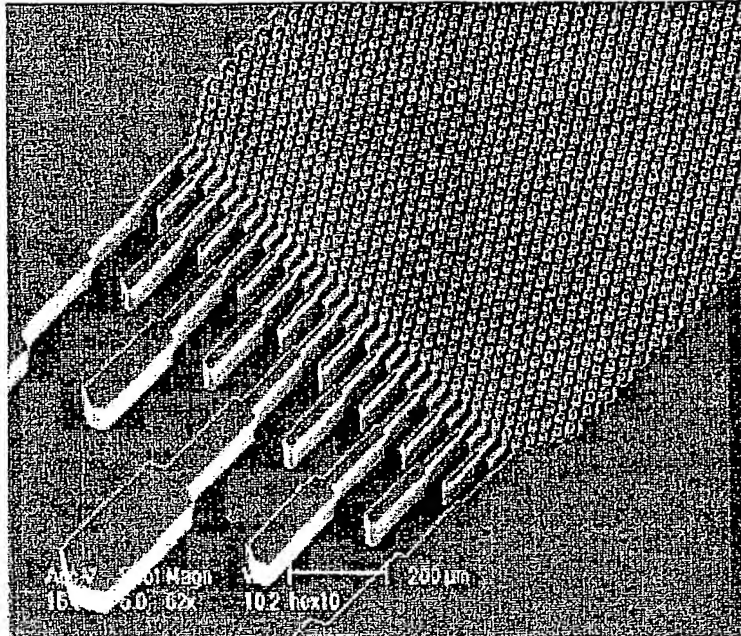


FIG. 6

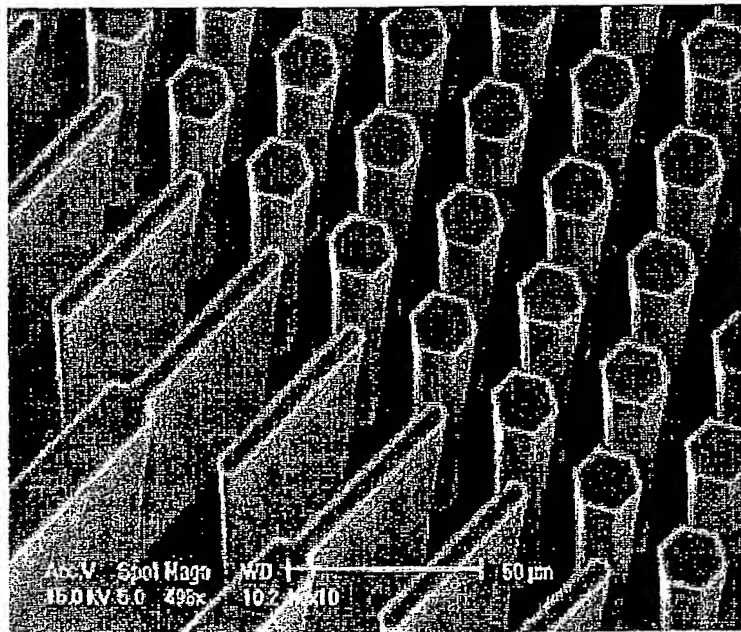


FIG. 7



2839660

N° d'enregistrement
national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 618680
FR 0206084

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	<p>SLENTZ B E ET AL: "Capillary electrochromatography of peptides on microfabricated poly(dimethylsiloxane) chips modified by cerium(IV)-catalyzed polymerization" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 948, no. 1-2, 1 mars 2002 (2002-03-01), pages 225-233, XP004339504 ISSN: 0021-9673 * figures 1,2 * * alinéas '0002!','0003! *</p>	1-34	B01J19/00 C12P1/00
D,X	<p>HE B ET AL: "FABRICATION OF NANOCOLUMNS FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 70, no. 18, 15 septembre 1998 (1998-09-15), pages 3790-3797, XP000784044 ISSN: 0003-2700 * figures 2-6 * * alinéas 'EXPERIMENTAL!','RESULTS! *</p>	1,2, 8-11, 13-20, 23, 26-29,31	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y		3-7,30, 32-34	B01J G01N B81B
A		12,21,22	
D,Y	<p>HE B ET AL: "Capillary electrochromatography of peptides in a microfabricated system" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 853, no. 1-2, 20 août 1999 (1999-08-20), pages 257-262, XP004178245 ISSN: 0021-9673 * alinéa '0002! *</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	3-7, 32-34	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2003		Polesello, P	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X: particulièrement pertinent à lui seul Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A: arrière-plan technologique O: divulgation non-écrite P: document intercalaire</p> <p>T: théorie ou principe à la base de l'invention E: document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D: cité dans la demande L: cité pour d'autres raisons &: membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



2839660

N° d'enregistrement
national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 618680
FR 0206084

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	XIONG L ET AL: "Channel-specific coatings on microfabricated chips" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 924, no. 1-2, 27 juillet 2001 (2001-07-27), pages 165-176, XP004273940 ISSN: 0021-9673 * figures 2,7 * * alinéas '0002!, '0003! *	30	
X	US 6 156 273 A (HE BING ET AL) 5 décembre 2000 (2000-12-05) * figures 1-7 * * colonne 3, ligne 36 - colonne 12, ligne 48 *	1,2, 8-29,31	
A		3-7,30, 32-34	
X	WO 99 09042 A (CEPHEID) 25 février 1999 (1999-02-25) * figures 1-15 * * page 15, ligne 2 - page 49, ligne 21 *	1,2,8-28	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A		3-7, 29-34	
A	WO 93 22053 A (UNIV PENNSYLVANIA) 11 novembre 1993 (1993-11-11) * figures 1-17 * * page 18, ligne 1 - page 50, ligne 25 *	1-34	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2003		Polesello, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant.	

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0206084 FA 618680**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 30-01-2003
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6156273	A	05-12-2000	EP	0985146 A1	15-03-2000
			WO	9854568 A1	03-12-1998
WO 9909042	A	25-02-1999	US	6368871 B1	09-04-2002
			AU	745989 B2	11-04-2002
			AU	8906698 A	08-03-1999
			CA	2301309 A1	25-02-1999
			EP	1003759 A2	31-05-2000
			JP	2001515216 T	18-09-2001
			WO	9909042 A2	25-02-1999
			US	2002175079 A1	28-11-2002
			AU	1947299 A	19-07-1999
			CA	2312102 A1	08-07-1999
			EP	1179585 A2	13-02-2002
			EP	1042061 A1	11-10-2000
			JP	2001527220 T	25-12-2001
			WO	9933559 A1	08-07-1999
			US	6440725 B1	27-08-2002
WO 9322053	A	11-11-1993	US	5304487 A	19-04-1994
			US	5296375 A	22-03-1994
			AT	155711 T	15-08-1997
			AT	167816 T	15-07-1998
			AT	140025 T	15-07-1996
			AT	140880 T	15-08-1996
			AT	174813 T	15-01-1999
			AU	677780 B2	08-05-1997
			AU	4222393 A	29-11-1993
			AU	680195 B2	24-07-1997
			AU	4222593 A	29-11-1993
			AU	677781 B2	08-05-1997
			AU	4222693 A	29-11-1993
			AU	4222793 A	29-11-1993
			AU	677197 B2	17-04-1997
			AU	4223593 A	29-11-1993
			CA	2134474 A1	11-11-1993
			CA	2134475 A1	11-11-1993
			CA	2134476 A1	11-11-1993
			CA	2134477 A1	11-11-1993
			CA	2134478 A1	11-11-1993
			DE	69303483 D1	08-08-1996
			DE	69303483 T2	06-02-1997
			DE	69303898 D1	05-09-1996
			DE	69303898 T2	20-02-1997
			DE	69312483 D1	04-09-1997
			DE	69312483 T2	12-02-1998

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0206084 FA 618680**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 30-01-2003
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9322053 A	DE	69319427 D1	06-08-1998
	DE	69319427 T2	10-12-1998
	DE	69322774 D1	04-02-1999
	DE	69322774 T2	17-06-1999
	EP	0637996 A1	15-02-1995
	EP	0637997 A1	15-02-1995
	EP	0639223 A1	22-02-1995
	EP	0637998 A1	15-02-1995
	EP	0637999 A1	15-02-1995
	ES	2106341 T3	01-11-1997
	ES	2127276 T3	16-04-1999
	GR	3025037 T3	30-01-1998
	GR	3029509 T3	28-05-1999
	HK	16897 A	13-02-1997
	HK	1001305 A1	16-11-2001
	JP	3298882 B2	08-07-2002
	JP	7506430 T	13-07-1995
	JP	7506431 T	13-07-1995
	JP	7506256 T	13-07-1995
	JP	3207424 B2	10-09-2001
	JP	7506257 T	13-07-1995
	JP	7506258 T	13-07-1995
	WO	9322053 A1	11-11-1993
<hr/>			

EPO FORM P0485

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)